Hygienisches Institut der Universität Berlin.

Die Verwertbarkeit der Aminosäuren durch Influenza-Bakterien.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der zahnärztlich-medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich Wilhelms-Universität zu Berlin.

Vorgelegt von

Karl Schwarz

Zahnarzt

aus Boltenhagen, Kreis Greifswald.

Tag der Promotion: 18. September 1935.

307

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Professor Dr. Magnus.

Referent: Privatdozent Dr. Ehrismann.

Korreferent: Professor Dr. Zeiss.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I.

In der Literatur ist in reichlichem Umfange über den Verwendungsstoffwechsel der Bakterien geschrieben worden. So hat Braun in seinem Buche: „Methoden zur Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels pathogener Bakterien" allgemeine Untersuchungsmethoden beschrieben und an einer Reihe Bakterien, wie unter anderem Diphtherie- und Coli-Bazillen, Versuche ausgeführt. Ueber den Verwendungsstoffwechsel der Influenza-Bakterien hingegen sind außer der Arbeit von Petrau im: „Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde" 1927, Bd. 103, S. 29 ff. „Versuche zur Züchtung des Bazillus influenzae (Bazillus Pfeiffer) auf synthetischen Nährböden" keine Versuche gemacht worden. Diese Arbeit befaßt sich auch nicht mit dem Verwendungsstoffwechsel in dem Sinne, wie Braun ihn als Begriff in der medizinischen Wissenschaft bearbeitet hat, als vielmehr mit der Frage der Züchtung der Influenza-Bakterien auf synthetischen Nährlösungen, ein Kapitel, das allerdings wertvolle Grundlagen für die Verwendungsstoffwechsel-Untersuchungen gibt. Wir haben uns daher die in der Literatur noch nicht gelöste Aufgabe gestellt, nach den unter anderen von Braun ausgearbeiteten Methoden, Untersuchungen über den Verwendungsstoffwechsel der Influenza-Bakterien anzustellen, und zwar in bezug auf den Faktor Stickstoff.

Die zu lösende Aufgabe besteht in der Frage, ob die Influenza-Bakterien ihren Stickstoffbedarf durch Aufnahme von Aminosäuren decken können sowie dieselben zu NH_3 abbauen.

Assimilation und Dissimilation von Stickstoff waren zu untersuchen. Assimilieren die Influenza-Bakterien die Aminosäuren oder bauen sie entsprechend ähnlichen Vorgängen in der Natur dieselben zu NH_3 ab, also dissimilieren sie die Aminosäuren? Diese Dissimilisation muß dann durch das Auftreten von freigewordenem NH_3 erkennbar sein. In diesem Sinne wurden diese Versuche von uns gemacht. Es wurden Nährlösungen hergestellt, in denen Aminosäuren als Stickstoffquelle benutzt wurden, und beobachtet, ob die Influenza-Bakterien in diesen wuchsen und sich vermehrten. Es wurden Ammoniakbestimmungen gemacht, um zu sehen, welche von den Aminosäuren die Influenza-Bakterien abbauen und in welchem Maße sich dieser Abbau vollzieht.

II.

In der vorliegenden Arbeit wird nun zunächst die Frage der Assimilation von Aminosäure-Stickstoff durch Influenza-Bakterien geklärt werden. Es mußte untersucht werden, welche chemisch genau definierbaren Stoffe notwendig sind, um ein Wachsen der Bakterien zu ermöglichen; denn nur durch den Abbau uns bekannter chemischer Größen in Maß und Zahl können wir genaue Ergebnisse erhalten. Chemisch undefinierbare Nährböden sind daher ungeeignet. Mit anderen Worten: Es mußte eine synthetische Nährlösung für Influenza-Bakterien gefunden werden, die diesen ermöglichte, ihr Protoplasma aufzubauen.

Die Schwierigkeit der Lösung der Frage für Influenza-Bakterien besteht darin, daß sie zum Wachsen und Vermehren der X- und V-Substanz bedürfen. Diese Substanzen sind im Blut enthalten, ihre chemische Konstitution ist indessen nicht näher bekannt. Bei den von uns hergestellten synthetischen Nährlösungen wurde nicht die X- und V-Substanz in der von Petrau hergestellten Art benutzt, sondern es wurde hämolysiertes Pferdeblut in der Verdünnung 1 : 1000 verwendet. Nach unserer Ansicht konnte der in dieser starken Verdünnung im Blut noch vorhandene Stickstoff nicht genügen, um den Bakterien ein Wachstum zu ermöglichen. Daß diese Ansicht richtig war, bewiesen die angestellten Kontrollversuche, in denen die synthetische Nährlösung keine Stickstoffquellen außer der in der Verdünnung 1 : 1000 vorhandenem Blut enthielten. Die Kontrollversuche zeigten keinerlei Wachstum von Influenza-Bakterien. Daher konnte den synthetischen Nährlösungen ohne weiteres der für die Influenza-Bakterien notwendige X- und V-Faktor in Form von Blut hinzugefügt werden, ohne daß mit Fehlern in bezug auf den Stickstoffverwendungsstoffwechsel gerechnet werden mußte. Die für die Influenza-Bakterien notwendigen sonstigen chemischen Komponenten wurden entsprechend den Versuchen von Petrau gewählt. Es fiel auf, daß Petrau anscheinend ohne Kohlenstoffquelle auskam, in unseren Versuchen verwandten wir hierzu Natriumacetat bzw. Natriumlactat. Als Stickstoffquelle gaben wir neben einer Versuchsreihe mit NH_4Cl und Pepton Witte Aminosäuren. Zur Untersuchung gelangten: Asparagin, Natrium-Asparaginat, Cystin, Alanin und Tyrosin. Die Auswahl der Aminosäuren erfolgte aus dem Grunde, weil wir in den weiter unten mitgeteilten Versuchen festgestellt hatten, daß Influenza-Bakterien im ruhenden Zustand (d. h. unter Ausschluß der Vermehrung) Asparagin, Natriumasparaginat und Cystin angreifen; Alanin und Tyrosin wurden aus Kontrollzwecken verwendet, obwohl aus ihnen von den Influenza-Bakterien kein NH_3 gebildet wird. Mit Pepton Witte und NH_4Cl wurden Versuche angestellt, weil gleichzeitig die Frage interessierte, ob diese Stoffe

genügen, um ein Wachsen und Vermehren der Influenza-Bakterien zu ermöglichen.

Methode:

Unsere Nährmedien enthielten auf:

100 ccm Aqua dest.
8 ccm NH_4Cl bzw. Asparagin,
Natriumasparaginat,
Cystin,
Alanin,
Tyrosin,
Pepton Witte.
4 ccm CH_3COO Na bzw. CH_3 CHOH COO Na
4 ccm Na H_2 PO_4
4 ccm Na_2 CO_3
0,2 ccm hämolysiertes Blut.

Die Mengen der einzelnen Komponenten wurden entsprechend den Angaben von Petrau gewählt. Es handelte sich bei allen um eine 0,1 mol. Lösung. Die Lösung wurde mit Phosphatpuffern auf ein Ph = 7,5 gebracht, mehrmals im Autoklaven sterilisiert und erst dann das hämolysierte Blut hinzugefügt. Die für diese Versuche hergestellte Kontrollösung bestand aus:

100 ccm Aqua dest.
6,66 ccm CH_3 COONa bzw. CH_3 CHOH COONa
6,66 ccm Na H_2 PO_4
6,66 ccm Na_2 CO_3
0,2 ccm hämolysiert. Blut.

Die Züchtung der Influenza-Bakterien in den synthetischen Nährlösungen geschah nach Braun. Von der Ausgangskultur wurden sie in 5 Passagen gezüchtet. Die Ausgangskultur wurde mit 2 Oesen Influenza-Bakterien, die vorher in Kochblutagarröhrchen in 24 Stunden gezüchtet worden waren, beimpft. Nach drei Tagen wurde aus der Ausgangskultur die I. Passage beimpft und so fort. Ausgeführt wurden zwei Züchtungen. Ueber den Verlauf der Züchtung I gibt Tabelle I nähere Auskunft. Bei der Züchtung II wurde insoweit eine Aenderung vorgenommen, als die Versuchsreihe Cystin fortgelassen wurde. Cystin wurde den synthetischen Nährlösungen, die Asparagin und Natriumasparaginat enthielten, mit diesen zu gleichen Teilen hinzugefügt. Ueber den Verlauf der Züchtung II gibt Tabelle II Auskunft. Gleichzeitig wurden bei der Züchtung II Bestimmungen des Trübungsgrades mit dem Mollschen Nephelometer ausgeführt, um Aufklärung über die Zahl der gewachsenen Bakterien zu erhalten (Tabelle III).

Als Ergebnis kann festgehalten werden, daß zwar kein optimales Wachstum der Influenza-Bakterien auf synthetischen Nährlösungen erreicht wurde, daß es aber gelang, in den

Tabelle I.

Influenza-Bazillen auf synthetischem Nährboden gezüchtet.

		Kontrolle I	Kontrolle II	NH_4 Cl I	NH_4 Cl II	Asparagin I	Asparagin II	Natrium asparaginat. I	Natrium asparaginat. II	4% Pepton Witte I	4% Pepton Witte II	Cystin I	Cystin II	Alanin I	Alanin II	Tyrosin I	Tyrosin II
	18. 5.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
Aus-	19. 5.	—	—	+	+	−+	−+	−+	−+	+	+	−+	−+	—	—	—	—
gangs-	20. 5.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Kultur	21. 5.	—	—	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+	+	−+	−+	−+	−+
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+
	21. 5.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
I.	22. 5.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	−+	−+	—	—	—	—
Passage	23. 5.	—	—	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+	+	−+	−+	−+	−+
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+
	23. 5.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
II.	24. 5.	—	—	++	++	+	+	++	++	++	++	+−	+−	—	—	−+	−+
Passage	25. 5.	—	—	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	—	—	−+	−+
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	25. 5.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
III.	26. 5.	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	—	—	—	—
Passage	27. 5.	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
	28. 5.	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	—	—	−+	−+
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	28. 5.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
IV.	29.5.	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	−+	−+
Passage	30. 5.	—	—	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	30. 5.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
V.	31. 5.	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	−+	−+
Passage	1. 6.	—	—	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	—	—	—	—
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

— = Keine Trübung ++ = stärkere Trübung
−+ = schwache Trübung +++ = starke Trübung.
+ = Trübung

Tabelle II.

Influenza-Bazillen auf synthetischem Nährboden gezüchtet in 5 Passagen.

		Kontrolle		NH_4 Cl		Asparagin u. Cystin		Na.-Aspar. u. Cystin		Pepton W.		Alanin		Tyrosin	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Ausgangs-Kultur	10. 6.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
	11. 6.	—	—	+	+	+	+	++	++	+	+	—	—	—	—
	12. 6.	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—+	—+
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
I. Passage	12. 6.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
	13. 6.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—+	—+
	14. 6.	—	—	+	+	++	++	++	++	+	+	—	—	—+	—+
	15. 6.	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—+	—+
	16. 6.	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—+	—+
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
II. Passage	16. 6.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
	17. 6.	—	—	+	+	—+	—+	+	+	+	+	—	—	—+	—+
	18. 6.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—+	—+
	19. 6.	—	—	++	++	+	+	++	++	+	+	—	—	—+	—
	20. 9.	—	—	++	++	++	++	+++	+++	++	++	—	—	—+	—
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
III. Passage	20. 6.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
	21. 6.	—	—	++	++	+	+	+++	+++	+	+	—	—	—+	—
	22. 6.	—	—	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	—	—	—+	—
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
IV. Passage	22. 6.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
	23. 6.	—	—	++	++	++	++	+++	+++	+	+	—	—	—+	—
	24. 6.	—	—	++	++	++	++	+++	+++	++	++	—	—	—+	—
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
V. Passage	24. 6.	Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft		Beimpft	
	25. 6.	—	—	++	++	++	++	+++	+++	++	++	—	—	—+	—
	26. 6.	—	—	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	—	—	—+	—
	Mikrosk.	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

Nährlösungen, die als Stickstoffquelle NH_4Cl, Asparagin bzw. Asparagin und Cystin, Natriumasparaginat bzw. Natriumasparaginat und Cystin, Cystin und Pepton Witte enthielten, überhaupt ein Wachstum zu erreichen. Keinerlei Wachstum zeigte sich in den Kontrollversuchen und den Versuchsreihen mit Alanin und Tyrosin. Von einem Wachstum von Influenza-Bakterien in der synthetischen Nährlösung, die Tyrosin enthielt, wird man trotz dem durch die Trübungsgrad-Bestimmungen festgestellten Vorhandensein von Bakterien nicht sprechen können, da die sich ergebende Anzahl schon in der I. Passage, mehr noch in der V. Passage gegen die der Ausgangskultur zurückbleibt. Beobachtet wurde ferner, daß das Wachsen in den ersten Passagen nicht so gut war, wie in den letzten. Erklärt wird diese Tatsache durch die Gewöhnung der Bakterien an die neuen Lebensbedingungen der synthetischen Nährmedien.

Tabelle III.

Anzahl der im ccm enthaltenen Influenza-Bazillen in Millionen.

		Stickstoffquelle:						
		Kontroll-Versuch	NH_4Cl	Aspar. u. Cyst.	Natr. Aspar. u. Cystin	Pept. Witte	Alanin	Tyrosin
Ausgangs-Kultur	2. Tag	10,8	58,8	53,6	102,4	78,4	0	48,0
	3. Tag	17	58,8	138,7	164,0	72,0	0	48,0
I. Passage	4. Tag	0	65,6	74,8	96,0	72,0	0	40
	5. Tag	0	58,8	88,0	126,4	78,4	0	16
II. Passage	4. Tag	0	65,6	74,8	96,0	72	0	40
	5. Tag	0	58,8	88,0	126,4	8,8	0	16
III. Passage	2. Tag	0	58,8	53,6	330,0	88	0	29,8
	3. Tag	0	184,0	138,7	440,0	106,8	0	24
IV. Passage	3. Tag	0	107,2	74,8	240,0	96	0	16
	4. Tag	0	107,2	138,7	400,0	106,8	0	24
V. Passage	2. Tag	0	112	74,8	336,0	120	0	24
	3. Tag	0	184	138,7	440,0	120	0	16

Während der Züchtung wurden laufend NH_3-Bestimmungen gemacht. Abstand wurde nur von diesen während des I. Bruttages in jeder Passage genommen, weil die Influenza-Bakterien in den ersten vierundzwanzig Stunden noch nicht in dem Maße gewachsen waren bzw. sich vermehrt hatten, als daß eine merkliche Abspaltung von NH_3 hätte nachgewiesen werden können. NH_3 Bestimmungen wurden in den einzelnen Passagen nach verschiedener Bebrütungsdauer ausgeführt, so bei der Züchtung I in der I. Passage am 3. Tage, in der II. Passage am 2. Tage, in der III. Passage am 2. Tage, in der IV. Passage am 3. Tage, in der V. Passage und in

der Ausgangskultur am 4. Tage. Bei der Züchtung II wurden in größerem Umfange NH_3-Bestimmungen gemacht, so wurden in der Ausgangskultur am 2. und 3. Tage, in der ersten und zweiten Passage am 4. und 5. Tage, in der III. Passage am 2. Tage, in der IV. Passage am 3. und 4. Tage, in der V. Passage am 2. und 3. Tage NH_3-Bestimmungen vorgenommen.

Betrachten wir nun die einzelnen Ergebnisse (siehe Tabellen IV und V!) Fehlerquellen konnten in bezug auf die NH_3-Bestimmungen insofern auftreten, als durch absterbende, zerfallende Influenza-Bakterien ein Mehr an NH_3 sich zeigen würde, andererseits infolge des den Influenza-Bakterien eigenen Kanibalismus, diese ihren Stickstoffbedarf durch die zerfallenen Influenza-Bakterien deckten. Diese mußten, soweit sie überhaupt nicht ausgeschaltet werden konnten, bei der Wertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Tabelle IV.

Von auf synthetischen Nährböden gezüchteten Influenza-Bazillen abgegebenes NH_3 in mg.

	als Stickstoffquelle:							
Wachstumstag	Kontrolle	NH_4Cl	Asparagin	Natrium-asparag.	Pepton Witte	Cystin	Alanin	Tyrosin
2. Tag der	0,068	0,510	0,204	0,612	0,170	0,136	0	0,068
II. Passage	0,068	0,510	0,272	0,476	0,136	0,102	0,034	0,034
2. Tag der	0,068	0,510	0,238	0,646	0,136	0,170	0	0,068
III. Passage	0,034	0,510	0,204	0,612	0,170	0,136	0,068	0,034
3. Tag der	0,068	0,952	0,510	0,272	0,272	0,272	0,068	0,068
I. Passage	0,034	0,952	0,442	0,340	0,306	0,238	0,102	0,102
3. Tag der	0,068	1,292	0,476	0,272	0,204	0,204	0,068	0,136
IV. Passage	0,068	1,292	0,510	0,306	0,238	0,238	0,034	0,102
4. Tag der	0,136	1,904	0,510	2,040	0,374	0,374	0,170	0,204
Ausggs.-Kult.	0,102	2,380	0,510	1,870	0,340	0,306	0,272	0,170
4. Tag der	0,068	1,734	0,442	1,700	0,340	0,340	0,068	0,068
V. Passage	0,068	1,836	0,476	1,632	0,238	0,238	0,034	0,102

In den Kontrolllösungen wird sowohl bei der Züchtung I als auch II kein NH_3 festgestellt. Die bei der Züchtung I gefundenen Werte von 0,068 mg etc. sind zu gering, als daß von einem vorhandenen Stoffwechsel geredet werden könnte. Eine synthetische Nährlösung ohne eine Stickstoffquelle genügt demnach, wie sowohl unsere auf den Tabellen I—III angeführten Wachstumsversuche als auch die NH_3-Bestimmungen zeigen, nicht, um den Influenza-Bakterien ein Wachsen und Vermehren zu ermöglichen.

Tabelle V.

Von auf synthetischen Nährböden gezüchteten Influenza-Bazillen abgegebenes NH_3 in mg.

	als Stickstoffquelle:					
	Kontrolle	NH_4Cl	Aspar. u. Cystin	Natriumaspar. u. Cystin	Pept. Witte	Alanin	Tyrosin
2. Tag der Ausg.-Kultur	0	1,292	0,306	0,772	0,102	0	0,119
2. Tag de- III. Passage	0	0,510	0,238	0,806	0,170	0,034	0,068
2. Tag der V. Passage	0	1,530	0,510	1,612	0,340	0	0,068
3. Tag der Ausg.-Kultur	0	1,360	0,510	0,578	0,204	0,068	0,034
3. Tag der IV. Passage	0	1,292	0,680	0,806	0,204	0	0,034
3. Tag der V. Passage	0	1,734	0,816	2,040	0,374	0	0
4. Tag der I. Passage	0	1,020	0,510	0,806	0,306	0	0,034
4. Tag der II. Passage	0	0,952	0,476	0,806	0,306	0	0,034
4. Tag der IV. Passage	0	1,360	0,510	1,700	0,340	0	0
5. Tag der I. Passage	0	1,292	0,680	1,632	0,204	0	0,034
5. Tag der II. Passage	0	1,292	0,510	1,870	0,340	0	0,034

Keine oder ähnliche Werte fanden sich bei den Untersuchungen, in denen Alanin den synthetischen Nährlösungen als Stickstoffquelle hinzugefügt worden war. Die Influenza-Bakterien können demnach Alanin als Stickstoffquelle nicht verwerten.

Auch die Werte in den Versuchsreihen mit Tyrosin zeitigten negative Resultate.

Anders ist es indessen mit Asparagin und Cystin. Hier wurden bis zu 0,8 bzw. 0,3 mmg NH_3 festgestellt. Obwohl diese Werte besonders für Cystin keine hohen sind, wird man schon davon reden können, daß Asparagin und Cystin von den Influenza-Bakterien angegriffen werden, um ihren Stickstoffbedarf aus ihnen zu befriedigen.

Zu beachten ist, daß der NH_3-Umbau mit wachsender Zahl der Bakterien steigt. So finden wir in der V. Passage bei einer Anzahl von 74,8 Millionen pro ccm einen NH_3-Nachweis von 0,510 mg, bei einer Anzahl von 138,7 Millionen pro ccm einen solchen von 0,816 mg.

Ein bei weitem besseres Wachstum zeigte sich in den synthetischen Nährlösungen, die Natriumasparaginat bzw. dieses mit Cystin zu gleichen Teilen enthielten.

In der V. Passage der Züchtung I finden wir am 4. Tage den Wert von 1,7 mg, in derselben der Züchtung II am 2. Tage den Wert von 1,6 mg, am 3. Tage von 2,04 mg NH_3. Auffallend ist, daß die NH_3-Werte bei längerer Bebrütung der Bakterien wieder sinken, so finden wir bei der Züchtung II am 4. Tage sowohl in der I. Passage als auch in der II. Passage nur Werte von 0,8 mg NH_3. Erklärt wird diese Tatsache dadurch, daß für ein längeres Bebrüten die synthetischen Nährlösungen nicht ausreichen, um dem Bedarf an Stickstoff zu genügen.

In den Nährlösungen, die Pepton Witte als Stickstoffquelle enthielten, wurde ein besseres Wachstum erwartet. Die erhaltenen Werte sind indessen so, daß man von einem Umbau noch insoweit reden kann, als den Influenza-Bakterien das Wachstum überhaupt ermöglicht wurde.

Als abschließendes Ergebnis dieser Versuche kann festgestellt werden, daß die Influenza-Bakterien eine Stickstoffquelle im Nährmedium benötigen, um zu wachsen und sich zu vermehren, daß Asparagin, Cystin und Natriumasparaginat diese sein können, wobei Natriumasparaginat als die beste angesprochen werden muß. Nicht imstande sind die Influenza-Bakterien, mit Alanin und Tyrosin auszukommen.

III.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden NH_3-Bestimmungen mit Influenza-Bakterien in **ruhendem** Zustand ausgeführt. Es sollten die Aminosäuren bestimmt werden, die die Influenza-Bakterien angreifen, d. h. die Aminosäuren zu NH_3 abbauen.

Zu diesem Zwecke wurden Influenza-Bakterien auf Kochblutagarröhrchen gezüchtet, von sechs Röhrchen nach 24 stündiger Bebrütung auf 25 übergeimpft. Diese wurden dann mit Phosphat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung, deren ph = 7,5 war, abgeschwemmt und dann auf 25 bzw. 36 Kolben überimpft. Es stand somit ausreichendes Material zur Verfügung. Die von den Kolben erhaltene Abschwemmung wurde mehrmals zentrifugiert und zu 20 ccm Abschwemmung eine 1 mol. Lösung Aminosäure hinzugefügt.

Folgende Aminosäuren wurden in den Versuchen verwandt: Alanin, Glykokoll, Leucin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Tryptophan, Tyrosin, Asparagin, Natriumasparaginat und Cystin, außerdem noch Pepton Witte.

Neben einer Lösung, die aus Abschwemmung und Aminosäure bestand, wurde eine Kontrolllösung hergestellt, die Abschwemmung und Phosphat gepufferte Kochsalzlösung enthielt. Diese Kontrolle war notwendig, um zu zeigen, daß der festgestellte NH_3-Wert auch vom Abbau der Aminosäure herrührte.

Die ersten NH_3-Bestimmungen wurden zu Beginn des Versuches vorgenommen, dann folgten sie nach 2,4 und 6 Stunden bei

Tabelle VI.

Von Influenza-Bazillen abgegebenes NH_4 in mg.

		Anal. vor dem Versuch		Anal. nach 2 Std.		Anal. nach 4 Std.		Anal. nach 6 Std.	
		Anal. I	Anal. II	Anal. I	Anal. II	Anal. I	Anal. II	Anal. I	Anal. II
Kontroll-	I.	0,238	0,170	0,204	0,204	0,170	0,238	0,272	0,238
versuche	II.	0,204	0,170	0,236	0,136	0,170	0,204	0,170	0,204
	III.	0,102	0,102	0,136	0,136	0,170	0,170	0,306	0,272
	IV.	0,136	0,102	0,102	0,170	0,136	0,136	0,238	0,204
	V.	0,102	0,170	0,102	0,136	0,170	0,170	0,238	0,272
	VI.	0,136	0,170	0,204	0,238	0,204	0,238	0,340	0,374
Durchschnittswert		0,136		0,153		0,187		0,272	
Alanin	I.	0,204	0,187	0,204	0,170	0,221	0,221	0,255	0,255
	II.	0,238	0,204	0,204	0,204	0,221	0,204	0,306	0,374
Durchschnittswert		0,204		0,204		0,221		0,306	
Glykokoll	I	0,068	0,034	0,170	0,153	0,170	0,204	0,238	0,272
	II.	0,136	0,170	0,170	0,136	0,136	0,170	0,204	0,228
Durchschnittswert		0,102		0,153		0,170		0,238	
Leucin	I.	0,068	0,034	0,102	0,102	0,102	0,102	0,272	0,272
	II.	0,136	0,102	0,162	0,136	0,204	0,170	0,204	0,272
Durchschnittswert		0,085		0,102		0,136		0,272	
Phenylalanin	I.	0,136	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170
	II.	0,102	0,136	0,102	0,136	0,136	0,136	0,238	0,238
Durchschnittswert		0,136		0,153		0,153		0,204	
Glutamin-	I.	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,238	0,204
säure	II.	0,170	0,136	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170
Durchschnittswert		0,170		0,170		0,170		0,204	
Trypthophan	I.	0,136	0,102	0,170	0,136	0,136	0,170	0,153	0,170
	II.	0,119	0,119	0,136	0,170	0,136	0,170	0,136	0,153
Durchschnittswert		0,136		0,153		0,153		0,153	
Tyrosin	I.	0,136	0,102	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170
	II.	0,102	0,136	0,136	0,136	0,170	0,170	0,170	0,170
Durchschnittswert		0,136		0,153		0,170		0,170	
Cystin	I.	0,272	0,238	0,306	0,306	0,306	0,340	1,870	1,190
	II.	0,204	0,238	0,238	0,230	0,340	0,442	1,700	1,734
Durchschnittswert		0,238		0,272		0,357		1,623	
Asparagin	I.	0,238	0,204	0,340	0,340	0,374	0,442	0,663	0,663
	II.	0,170	0,102	0,238	0,272	0,306	0,340	0,510	0,544
Durchschnittswert		0,170		0,306		0,374		0,576	
Natrium-	I.	0,238	0,204	0,442	0,510	0,510	0,680	1,700	1,360
asparagin	II.	0,272	0,374	0,476	0,612	0,612	0,714	2,040	1,802
Durchschnittswert		0,272		0,510		0,646		1,724	
Pepton-	I.	1,258	1,258	1,360	1,448	1,700	1,530	1,700	1,700
Witte	II.	0,918	0,918	1,448	1,360	1,530	1,700	1,734	1,734
Durchschnittswert		1,088		1,394		1,615		1,717	

Aufenthalt bei 37°. Die NH_3-Bestimmungen wurden mit 5 ccm Lösung ausgeführt, die durch Filtration der Bakterienaufschwemmung durch ein Seitzfilter erhalten war. Die weitere Bestimmung wurde wie üblich ausgeführt.

Ueber die erhaltenen Werte gibt Tabelle VI. Auskunft.

Aus den Werten geht hervor, daß die Influenza-Bakterien aus Alanin, Glykokoll, Leucin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Tryptophan und Tyrosin überhaupt kein NH_3 abspalten konnten. Die erhaltenen Werte sind fast genau die gleichen wie in den Kontrollversuchen.

Anders ist es indessen mit Cystin, Asparagin und Natriumasparaginat. Bei Cystin und Natriumasparaginat stieg der NH_3-Wert um fast 1,5 mg nach 6stündiger Bebrütung, bei Asparagin um 0,4 mg.

Zusammenfassung:

Als Ergebnis unserer Arbeit können wir feststellen:

1. Es gelang, Influenza-Bakterien auf synthetischen Nährlösungen zu züchten, die als Stickstoffquelle enthielten: Natriumasparaginat, Asparagin, Cystin, Pepton Witte oder NH_4 Cl. Ein Wachstum ließ sich nicht erzielen in den Nährlösungen mit Alanin und Tyrosin als Stickstoffquelle.
2. Die Höchstwerte der **Ammoniak**abspaltung durch wachsende Influenza-Bakterien betrug für Natriumasparaginat und Cystin 2,04 mg, für Asparagin 0,816 mg, für Cystin 0,368 mg, für Pepton Witte 0,374 mg.
3. Bei den Untersuchungen mit ruhenden Influenza-Bakterien konnte festgestellt werden, daß diese aus Alanin, Glykokoll, Leucin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Tryptophan und Tyrosin kein NH_3 abspalten, wohl aber aus Natriumasparaginat, Asparagin, Cystin und Pepton Witte.
4. Die Höchstwerte der Ammoniakabspaltung betrugen für Cystin 1,623 mg, für Asparagin 0,576 mg, für Natriumasparaginat 1,724 mg, für Pepton Witte 1,717 mg auf 5 ccm Abschwemmungssubstanz.

Herrn Privatdozent Dr. Ehrismann danke ich für die freundliche Ueberlassung des Themas und für sein verständnisvolles Eingehen auf die während der Arbeit sich ergebenden Fragen. Weiter danke ich Herrn Professor Dr. Zeiss für die Erlaubnis, diese Arbeit im Hygienischen Institut der Friedrich-Wilhelms-Universität anfertigen zu dürfen.

Literatur-Verzeichnis:

H. Braun: Methoden zur Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels pathogener Bakterien. — Berlin 1930.

A. Fodor: Nachweis, Bestimmung und Synthese der Monoaminosäuren. Aus Abderhalden: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. — Berlin 1925.

Loewenthal und **Zurukzoglu**: Die Gruppe der hämonoglobinophilen Bakterien. Aus Kolle, Kraus, Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Band V. 2, S. 1271 f. Jena 1928.

Kollath, W: Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenza-Bakterien. 1. Abt. Orig. 1925. Bd. 95, S. 158 ff. — Zbl. f. Bakt.

— Rolle des sog. X-Faktors für die Biologie der Influenza-Bakterien. Orig. 1925. Bd. 25, S. 279. — Zbl. f. Bakt.

Kopp: Ueber das Verhalten der Influenza-Bakterien in anäeroben Kulturen unter besonderer Berücksichtigung des X- und V-Faktors. — Zbl. f. Bakt. 1927. S. 54.

Petrau, G: Versuche zur Züchtung des Bakterium influenzae auf synthetischen Nährböden. — Zbl. f. Bakt. 1. Abt. Orig. 1927. Bd. 103, S. 29 ff.

Ruszczynski, P.: Leitfaden für biochemische Mikromethoden. — Berlin 1926.

Lebenslauf.

Als Sohn des Schulrats i. R. Karl Schwarz und seiner Ehefrau Anna, geb. Schumacher, bin ich, Karl Schwarz, am 5. Juli 1907 zu Boltenhagen adl., Kreis Greifswald, geboren. Nach bestandener Reifeprüfung am Realgymnasium zu Swinemünde im Jahre 1925 studierte ich zunächst an den Universitäten Heidelberg und Berlin Jurisprudenz, vom Sommersemester 1931 an in Rostock und Berlin Zahnmedizin und Medizin. Am 1. August 1932 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung in Berlin, am 1. August 1933 die ärztliche Vorprüfung in Rostock. Am 21. Dezember 1934 beendete ich das zahnärztliche Staatsexamen vor dem Prüfungs-Ausschuß in Berlin mit dem Prädikat „gut". Am 18. 9. 1935 promovierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Berlin zum Dr. med. dent. mit dem Prädikat „magna cum laude".